Aus dem Max-Planck-Institut für Arbeitsphysiologie Dortmund
Direktor: Prof. Dr. D. W. Lübbers

# Eine Methode zur Messung von $HbO_2$-Gradienten in dünnen Membranen

## Ein Beitrag zum Phänomen der "Facilitated Diffusion"

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Beate Schneider, geb. Behrendt
aus Hamburg

Marburg/Lahn 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

Aus dem Max-Planck-Institut für Arbeitsphysiologie Dortmund
Direktor: Prof. Dr. D. W. Lübbers

# Eine Methode zur Messung von $HbO_2$-Gradienten in dünnen Membranen

## Ein Beitrag zum Phänomen der "Facilitated Diffusion"

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von

Beate Schneider, geb. Behrendt
aus Hamburg

Marburg/Lahn 1972

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 7. 4. 1972

gedruckt mit Genehmigung der Fakultät
Dekan: Prof. Dr. H. Oepen
Referent: Prof. Dr. D.W. Lübbers
Correferent: Prof. Dr. D. Braasch

# Inhaltsverzeichnis


| | | Seite |
|---|---|---|
| I. | Einleitung | 1 |
| II. | Theorie | 3 |
| III. | Methodik | 8 |
| IV. | Versuchsbedingungen | 11 |
| | Hämoglobin | 11 |
| | Filter | 11 |
| | Diffusionsversuch | 12 |
| | Gelatine | 17 |
| | Anfertigen des Mikroskopschnitts im Gefriermikrotom | 18 |
| | Aufnahme der Spektren | 19 |
| | Auswertung | 22 |
| V. | Ergebnisse | 24 |
| VI. | Diskussion | 29 |
| VII. | Zusammenfassung | 31 |
| VIII. | Literatur | 32 |

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546005_0039

## I. E i n l e i t u n g

Die Entwicklung vom einzelligen Lebewesen zu einem hoch differenzierten Organismus wäre ohne die Ausbildung eines weit verzweigten Gefäßsystems nicht möglich gewesen, da die Möglichkeit einer Ernährung im weitesten Sinne ausschließlich auf dem Wege der Diffusion zu begrenzt ist. Aber auch mit einem ausreichenden Gefäßsystem ist das Problem des Sauerstofftransports zu den energieverbrauchenden Geweben noch nicht überwunden, da die Löslichkeit des Sauerstoffs in Wasser sehr gering ist. Diese Schwierigkeit wurde durch die Entwicklung Sauerstoff-bindender Proteine in mannigfaltiger Form bewältigt, die weitaus mehr Sauerstoff in gebundener Form an den Ort des Bedarfs transportieren können, als es Wasser möglich wäre.

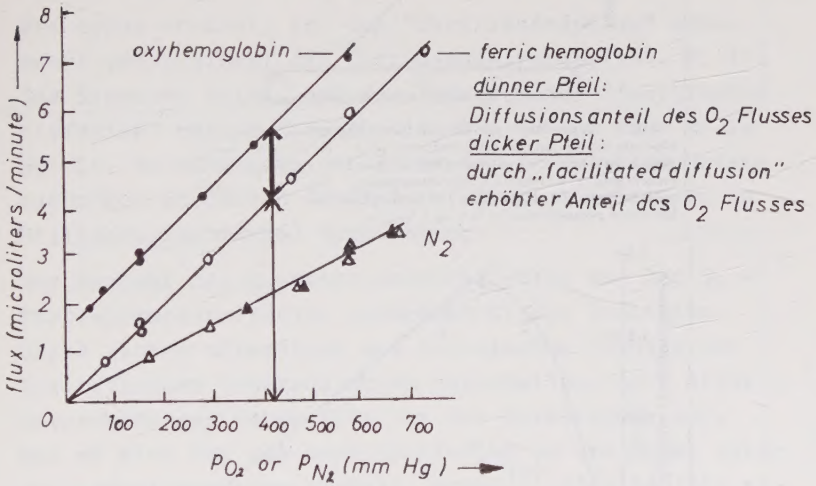
Nun findet man diese Proteine nicht nur im Gefäßsystem, sondern, zum Beispiel das Myoglobin, auch in der Muskelzelle. Da es dort sicher nicht die einfache Sauerstoffdiffusion unterstützt, könnte die Frage aufgeworfen werden, ob es nicht wie eine Art Förderband die Sauerstofflieferung an den kontraktilen Apparat beschleunigt oder vergrößert. Diese Vorstellung wäre auch auf den Sauerstofftransport innerhalb des Erythrozyten mit Hilfe des Hämoglobins anwendbar.

Roughton[11] war 1932 der erste, der sich mit diesem Problem beschäftigte. Bei dem Versuch, ein Modell von der Funktion des Myoglobins im Muskel zu gewin-

nen, konnten Wittenberg[15] und Scholander[12] unabhängig voneinander nachweisen, daß sich unter Gleichgewichtsbedingungen in Hämoglobinlösungen ein größerer Sauerstoff-Fluß findet, als nach den Diffusionsgesetzen zu erwarten ist. Dieses Phänomen ist als "facilitated diffusion" bekannt geworden und hat eine große Zahl experimenteller und theoretischer Untersuchungen ausgelöst.

## II. T h e o r i e

Nach übereinstimmender Meinung verschiedener Autoren setzt sich der erhöhte Diffusionsstrom aus zwei Teilen zusammen: dem gewöhnlichen, von der Anwesenheit des Hämoglobins unabhängigen $O_2$-Fluß und einem zusätzlichen "hemoglobin-facilitated-flux". Das konnte Wittenberg[16] 1965 durch einen Vergleich der Diffusion in Ferri- und Ferro-Hämoglobinlösung zeigen.




Aus dem Diagramm geht weiter hervor, daß die Größe des "facilitated flux" bei einer bestimmten Hämoglo-

binkonzentration von der Größe des Sauerstoffdrucks unabhängig ist. Das bedeutet, daß selbst bei einem geringen Diffusionsstrom in Gegenrichtung auch ein entgegengesetzter "facilitated flux" auftritt[5]. Wittenberg[16] zeigte auch, daß die Größe des erhöhten $O_2$-Flusses umgekehrt proportional der Diffusionsstrecke ist und bei zunehmender Größe der $O_2$-bindenden Proteine abnimmt.

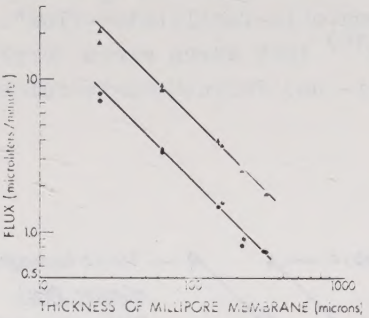



FIG. 4. Dependence of the gas fluxes through a hemoglobin solution on the length of the diffusion path. *Solid circles*, hemoglobin-facilitated component of the oxygen flux (facilitated flux); *solid triangles*, nitrogen flux per atmosphere. The [illegible] drawn with a slope of 1, expressing the assumption that [illegible] are inversely proportional to the path length.

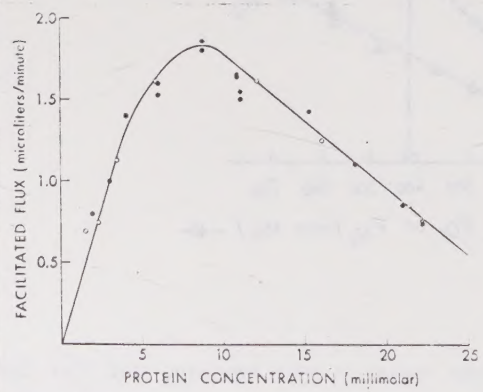


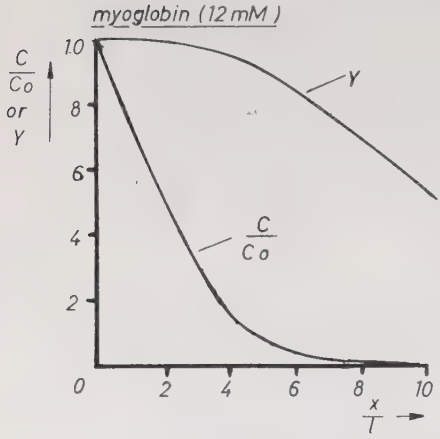

FIG. 5. Dependence of the hemoglobin-augmented component of the oxygen flux (facilitated flux) on protein concentration. *Solid circles*, hemoglobin; *open circles*, myoglobin. Millipore filter, type HA, 150 $\mu$ thick. All of the concentrations are expressed as millimoles of heme per liter.

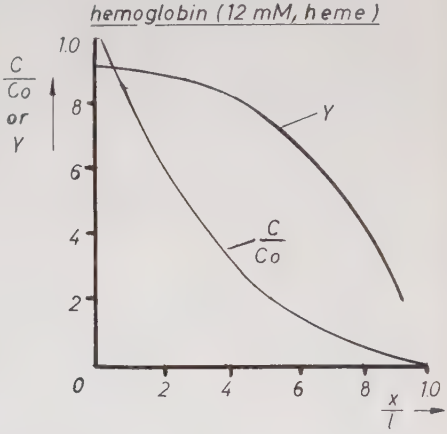
Daraus kann geschlossen werden, daß die Gegenwart dieser Proteine allein noch nicht genügt, um den Effekt des "facilitated flux" hervorzurufen. Es muß zusätzlich eine Diffusion der $O_2$-Trägermoleküle von Regionen hohen Sauerstoffpartialdrucks zu welchen mit niedrigem Partialdruck erfolgen. Dem entspricht auch die Tatsache, daß bei Zunahme der Viskosität (hohe Proteinkonzentrationen) die "facilitation" abnimmt und bei einer Konzentration der Hämoglobinlösung von 34 % zum Erliegen kommt. Diese experimentellen Ergebnisse haben die ältere Vorstellung eines "Eimerketten-Mechanismus", bei dem der Sauerstoff von Trägermolekül zu Trägermolekül weitergereicht wird[12], widerlegt.

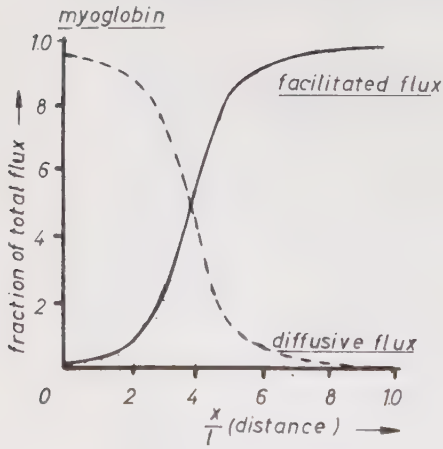
Wie schon erwähnt, ist der "facilitated flux" umgekehrt proportional der Diffusionsstrecke (Abb. S. 4). Das Diagramm zeigt, daß das Phänomen der "facilitated diffusion" nur im Bereich bis etwa 300 µm eine Rolle spielt. Daher wurden sämtliche experimentellen Untersuchungen an dünnen Schichten (Hämoglobinlösungen in Millipore-Membranen) vorgenommen.

Der Verlauf des $O_2$-Sättigungsgradienten und des $O_2$-Partialdruckgradienten innerhalb dieser Schichten blieb bisher allerdings aus technischen Gründen nur theoretischen Untersuchungen vorbehalten. Auch diese Untersuchungen gehen alle von der Vorstellung aus, daß es sich bei dem Sauerstoff-Fluß um die Summe zweier Diffusionsströme handelt. Wyman[18] stellte 1966 eine Gleichung auf, der zu entnehmen ist, daß innerhalb der untersuchten Schicht der Gesamt-$O_2$-Fluß an jeder

Stelle derselbe ist, daß jedoch das Verhältnis von freiem und gebundenem Sauerstoff, die zusammen den Gesamtfluß ausmachen, von Stelle zu Stelle wechseln kann. Von Murray[10], der die Wyman'sche Gleichung durch bestimmte Voraussetzungen vereinfachte, stammen die folgenden Diagramme.




$\frac{C}{Co}$ = oxygen concentration

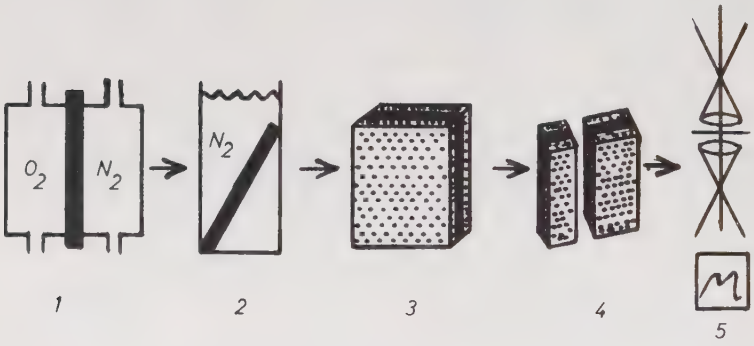
Y = fractional saturation

Kreuzer und Hoofd[8)] stellten anhand von Computer - untersuchungen, bei denen numerische Lösungen für unterschiedliche Bedingungen gewonnen wurden, fest, daß die Gradienten von Sauerstoff und Oxyhämoglobin im Schichtquerschnitt nicht denen entsprechen, die beim Vorliegen eines chemischen Gleichgewichtes zu fordern wären. Insbesondere fanden sie, daß die Sättigung an der Seite, die einer Gasphase mit hohem Sauerstoffdruck ausgesetzt ist, niedriger ist und umgekehrt, daß die Sättigung an der Seite, die einer Gasphase mit sehr niedrigem Sauerstoffdruck ausgesetzt ist, höher ist, als bei chemischem Gleichgewicht zu erwarten wäre.

## III. Methodik

Das Ziel dieser Arbeit war es, die methodischen Voraussetzungen für eine experimentelle Untersuchung des Oxyhämoglobin-Gradienten innerhalb dünner Schichten unter steady-state-Bedingungen zu schaffen.

Die beste Möglichkeit hierzu schien der folgende Weg zu bieten:




1) Herstellung eines $Hb \cdot O_2$-Gradienten in einer mit Hämoglobin getränkten Membran in einer Diffusionskammer, die durch diese Membran unterteilt wird.

2) Einfrieren dieses Zustands in der Membran durch sehr schnelle Überführung in flüssigen Stickstoff.

3) Anfertigung eines Schnittblocks durch Aufbringen von Gelatine auf die Membranflächen.

4) Anfertigung eines Dünnschnittes im Gefriermikrotom.

5) Messung von Hämoglobinspektren im Querschnittsverlauf der Membran im UMSP(Universal-Mikro-Spektralphotometer).

6) Auswertung der Summenspektren mit dem Mehrkomponenten-Verfahren.

Dieser Versuchsweg sah sich gangbar an. Die offenen Fragen waren:

1.) Kann die Überführung der Membran in den flüssigen Stickstoff so schnell erfolgen, daß kein weiterer Sauerstoff die Möglichkeit hat, besonders mit der Oberfläche des Filters zu reagieren?

2.) Beim Eintauchen des warmen Filters in den flüssigen Stickstoff tritt das sogenannte "Leidenfrost'sche Phänomen auf. Kommt es auf diesem Wege zu einer Reaktion des im flüssigen Stickstoff noch vorhandenen Sauerstoffs mit dem Hämoglobin des Filters?

3.) Diffundiert evtl. Sauerstoff aus der Membran?

4.) Läßt sich ein mikroskopisches Schnittpräparat herstellen, d.h. eine warme Gelatineschicht auf die gefrorene Membran aufbringen, ohne daß eine Reaktion stattfindet?

5.) Ist die Temperatur während der Herstellung des Dünnschnitts tief genug, um die Aufrechterhaltung des eingestellten Sättigungszustandes zu gewährleisten?

6.) Tritt eine Änderung bei der Überführung des Präparates in das Photometer ein?

Alle diese Fragen lassen sich mit einem einzigen Experiment beantworten: Stellt man in der Diffusionskammer durch beidseitiges Begasen mit Argon eine vollkommen desoxygenierte hämoglobinhaltige Membran her, und kann man im Photometer nach erfolgter Aufarbeitung über den ganzen Membranquerschnitt vollständig reduzierte Hämoglobinspektren zeigen, dann ist damit bewiesen, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen keine Reaktion mit Sauerstoff eintritt.

## IV. Versuchsbedingungen

### Hämoglobin

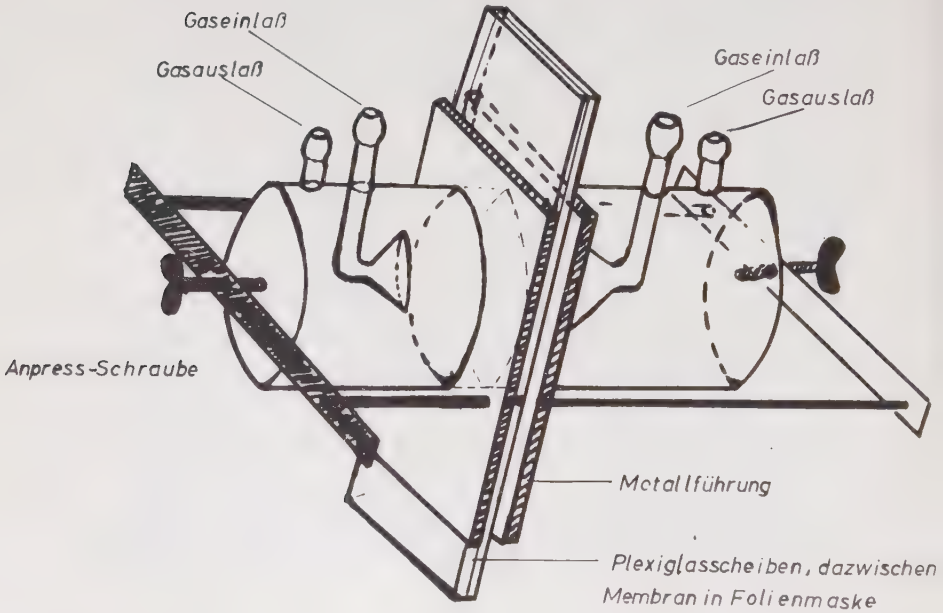
Wegen der geringen Haltbarkeit von Rattenhämoglobin wurden die Versuche mit menschlichem Hämoglobin durchgeführt. Das Hämoglobin wurde nach der Reinigung[16] und Hämolyse in 0,1 m Phosphatpuffer von $p_H$ 7,38 aufgenommen und in Kollodiumbeuteln der Firma Sartorius, Göttingen durch Druckfiltration konzentriert. Die Lösung ist bei 0 °C mindestens zwei Wochen haltbar. Für die optimale Schnittdicke von 12 bis 14 µm im Gefriermikrotom eigneten sich zur Erreichung brauchbarer Signale am besten Hämoglobinkonzentrationen von etwa 10 bis 12 mM/l. In diesem Konzentrationsbereich liegt glücklicherweise auch das Maximum der "facilitated diffusion".

### Filter

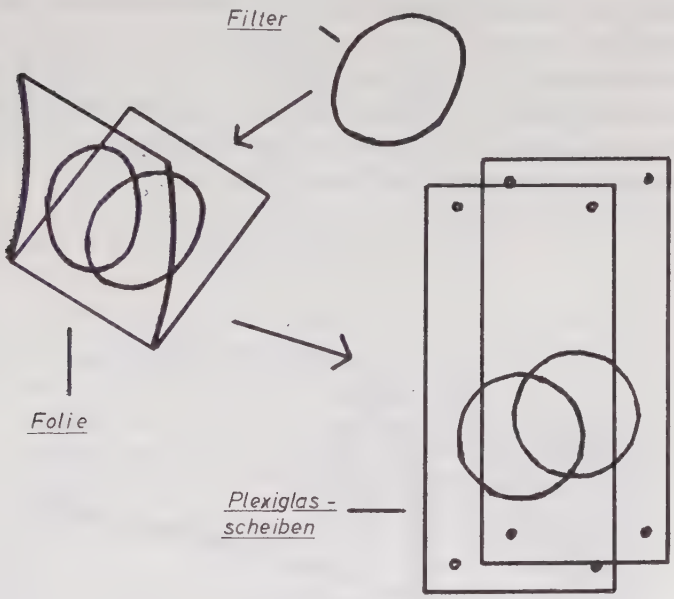
Für die Versuche wurden ausschließlich Millipore-Filter, Type HA, Porenweite 0,45 um, Dicke 150 um verwandt. Sie bestehen zu mehr als 80 % aus Poren und quellen nicht in Wasser. Die Filter wurden mit dem Rand in die Hämoglobinlösung getaucht und konnten sich langsam vollsaugen. Taucht man den Filter nämlich ganz in die Lösung ein, (wie bei den meisten Autoren beschrieben) so bleibt eine Flüssigkeitsschicht auf der Oberfläche haften, die während des Versuchs abläuft, das heißt aber, daß sich die Dicke der Membran und damit die Randbedingungen laufend ändern.

Diffusionsversuch

Die für unsere Versuche verwendete Diffusionskammer wurde in Anlehnung an die von Wittenberg[16] benutzte Kammer gebaut. Da es in unserer Versuchsanordnung aber möglich sein mußte, die Membran nach der Einstellung des $Hb.O_2$-Gradienten so schnell wie möglich in flüssigen Stickstoff zu überführen, sahen wir eine Führung vor, in der zwei durchbohrte Plexiglasscheiben die Membran halten, und gegen die die beiden Kammerteile mit einer Spannvorrichtung gepreßt werden können. Die Abdichtung erfolgt mit O - Ringen. Die folgende Abbildung zeigt den schematischen Aufbau.

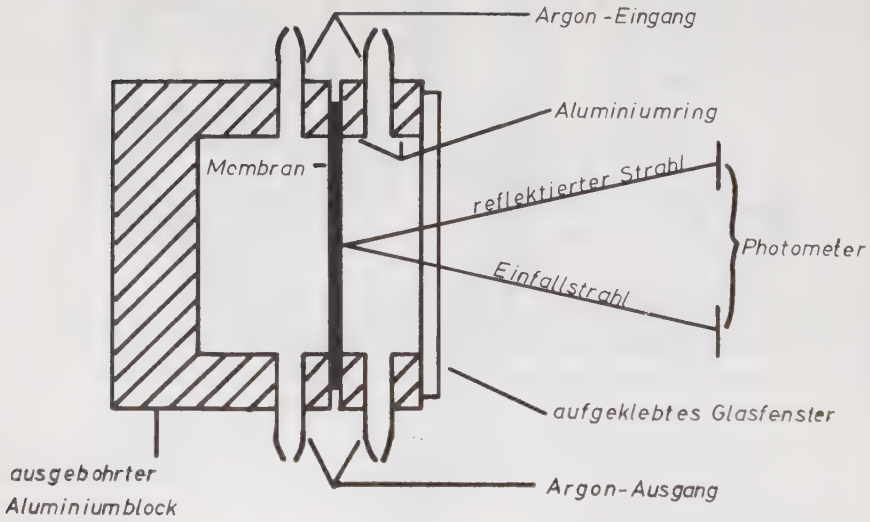


Um das Leersaugen der hämoglobinhaltigen Membran durch den sich zwischen den beiden Plexiglasscheiben bildenden dünnen Spalt zu vermeiden, wurde die Membran in eine beidseitige Maske aus selbstklebender Klarsichtfolie gepackt.




Die beiden Gasräume wurden bei jedem Versuch mit feuchtem Filterpapier ausgekleidet, und zusätzlich wurden in jede der beiden zuführenden Gasleitungen drei mit Wasser gefüllte Frittenflaschen geschaltet, um eine möglichst vollkommene Wasserdampfsättigung zu erreichen. Die Waschflaschen wurden 15 Minuten mit dem zu verwendenden Gas äquilibriert.

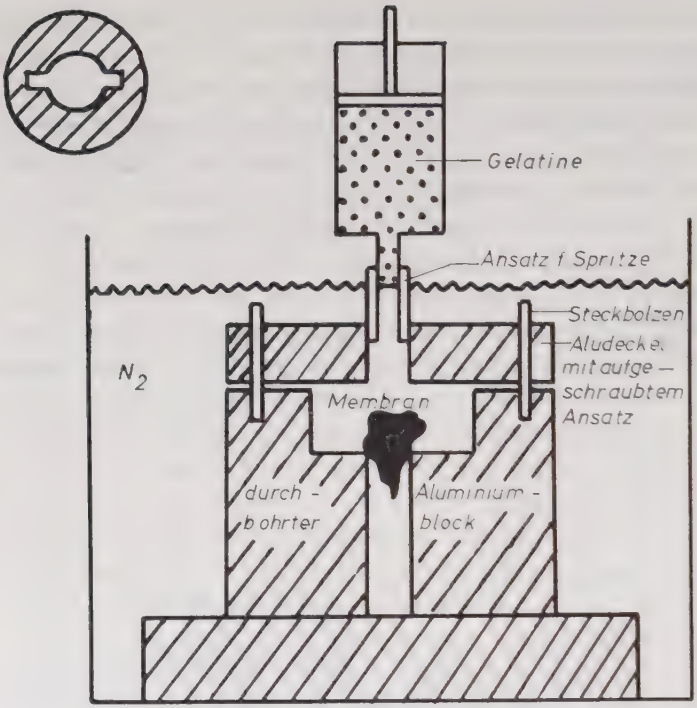
Beim Diffusionsversuch klemmten wir die hämoglobinhaltige Membran in der Maske zwischen die Plexiglasscheiben und brachten die ganze Anordnung in die Führung der Diffusionskammer, wo noch die Höhe justiert und die Klemmvorrichtung festgezogen wurde. Die Gasströme waren bereits beim Äquilibrieren der Waschflaschen auf einen Fluß von ca 80 ml/min eingestellt worden.
Die Zeit bis zur vollständigen Desoxygenierung eines mit Hämoglobin getränkten Filters bestimmten wir in einem Vorversuch mit einer einfachen Diffusionskammer zu weniger als zehn Minuten.



Den Diffusionsversuch beendeten wir anhand dieser Richtgröße nach fünfzehn Minuten.
Dazu wurden nach vorsichtiger Lockerung der Spannvorrichtung die Plexiglasscheiben mit einem kräftigen Schlag mitsamt der Membran in das dicht unter die Kammer gestellte, styroporummantelte Aluminiumgefäß mit flüssigem Stickstoff gebracht.
Der flüssige Stickstoff wurde soweit abgegossen, daß die einzelnen Membransplitter gut zu sehen waren. Gleichzeitig wurde ein zweites, kleineres Gefäß mit flüssigem Stickstoff gefüllt, und in dieses mit einer mit flüssigem Stickstoff gefüllten Wanne ein geeignetes Membranbruchstück überführt. Zum Aufbringen der warmen Gelatine wurde dieses Bruchstück dann in einen durchbohrten Aluminiumblock gebracht. Nachdem der Deckel aufgesetzt worden war, wurde die Gelatine aus der Spritze gedrückt. Die Viskosität der Gelatine -abhängig von der Temperatur und Konzentration- war dann richtig, wenn sie gerade bis zum Ende der Bohrung gelangte, bevor sie erstarrte! Alle Arbeiten bis zu diesem Zeitpunkt wurden in flüssigem Stickstoff ausgeführt!

Die Abbildung auf der nächsten Seite zeigt einen Schnitt durch die Versuchsanordnung.

Aufsicht des durchbohrten Aluminiumblocks

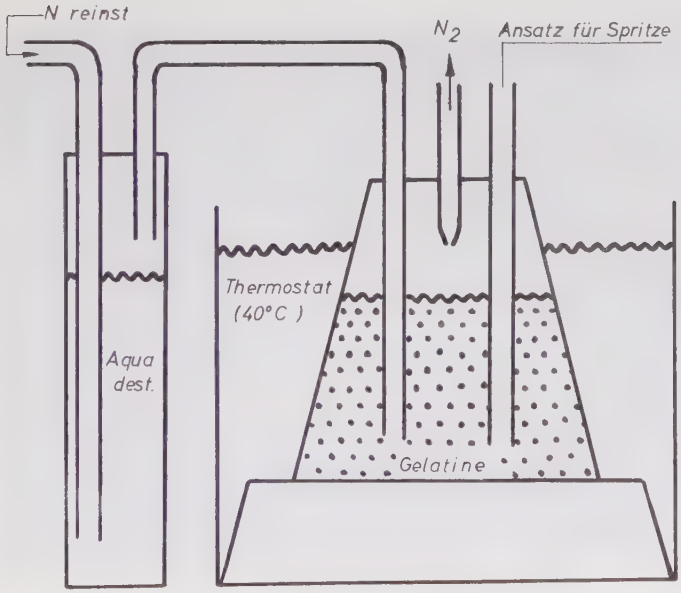



Dann wurde der Deckel abgehoben, das Unterteil mit dem eingehetteten Membranbruchstück umgekehrt und eine passende, mit flüssigem Stickstoff gefüllte Kanne gelegt und das Präparat mittels Hammer und Dorn aus der Bohrung geschlagen. Damit das

dieser Manipulation nicht in Stücke brach, kleideten wir die Bohrung vorher mit Aluminiumfolie aus. Diese konnte man leicht mit einer Pinzette von dem Gelatineblock in flüssigem Stickstoff abwickeln.

Gelatine

Zunächst äquilibrierten wir die Waschflasche und das Kölbchen, in das wir 25 ml aqua dest vorlegten, 15 Minuten, indem wir $Stickstoff_{reinst}$ durchperlten. Der Thermostat war auf 40 °C geheizt. Dann gaben wir 2,5 g kleingeschnittene Gelatine in das Kölbchen und ließen den Stickstoff weiterperlen. Durch den Rühreffekt des Stickstoffs löste sich die Gelatine langsam auf und war nach drei Stunden frei von Sauerstoff und gebrauchsfertig.



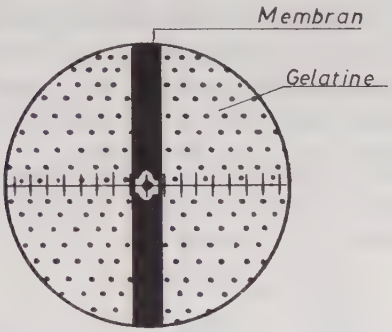
Anfertigen des Mikroskopschnitts im Gefriermikrotom

Im Gefriermikrotom wurde eine Temperatur von - 60 °C eingestellt. Mit einem Wassertropfen wurde das eingebettete Membranstück auf einer Korkunterlage aufgefroren und konnte dann geschnitten werden. Als optimale Schnittdicke fanden wir 12 bis 14 µm. Der Schnitt wurde dann zwischen zwei dünne Glasplättchen gelegt und auf einer mit flüssigem Stickstoff gekühlten Unterlage zum Photometer gebracht.

Der verwendete Typ des Kryostat-Mikrotoms nach Pearse der Firma SLEE ermöglicht durch weitgehende Handhabung der Arbeitsgänge von außen eine gute Einhaltung der im Gerät herrschenden Temperatur, was für die Anfertigung gleichmäßig dünner Schnitte und für die Aufrechterhaltung eines vorliegenden Hb.$O_2$-Gradienten in der quergeschnittenen Membran gleichermaßen von besonderer Bedeutung ist.

Aufnahme der Spektren

Bei der Betrachtung des Dünnschnittpräparates im Mikroskop bietet sich etwa folgendes Bild:




Durch Abtastung von äquidistanten Strecken in der x - Richtung und Aufzeichnung sowie Auswertung der Summenspektren kann man die Hämoglobinsättigung im Filterquerschnitt bestimmen. Bei homogener Sättigung (z.B. bei voll desoxygenierten Membranen) ist die Wahl der Blende belie ig. Will man jedoch einen $Hb.O_2$ - Sättigungsverlauf aufzeichnen, so wählt man vorteilhaft eine kleine Blende(Durchmesser des Meßfeldes = 2 µm).

Bei den Versuchen mit vollkommen desoxygenierten Membranen wurden jeweils die beiden Ränder und die Mitte photometriert. In den Fällen, wo Sättigungs-

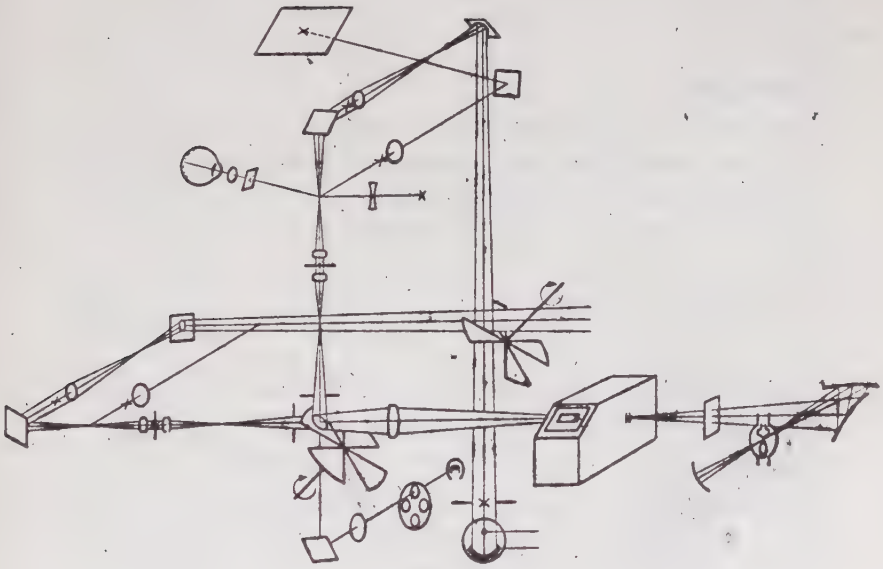
kurven gemessen werden sollten, wurde der Membranquerschnitt in vierzehn gleiche Strecken unterteilt, wodurch fünfzehn Meßpunkte zustande kommen. Die Extinktionswerte der Spektren wurden von 630 bis 515 nm registriert, und zwar synchron einmal auf einen Papierschreiber und, nach Digitalisierung, auf ein Magnetband. Die auf Magnetband aufgezeichneten Werte wurden für die Computerauswertung verwendet.

Während der Spektrenaufzeichnung wurde das Präparat durch einen an das Photometer angeschlossenen Kryostaten in einer Mikroskopkühlkammer auf ca. - 100 °C gekühlt.

Durch die Abnahme der Freiheitsgrade einer Molekel bei Abkühlung ändern sich ihre Absorptionseigenschaften in der Weise, daß die Spektren schärfere Banden zeigen. Auch Hämoglobin zeigt einen Temperatureffekt [3a]. Für unser Problem ist die Änderung an sich bedeutungslos. Es muß nur unbedingt darauf geachtet werden, daß die Temperatur beim Photometrieren der Membranquerschnitte mit der Temperatur übereinstimmt, die bei der Aufnahme der Grundspektren für die Rechnerauswertung herrschte.

Mit dem verwendeten Universal-Mikro-Spektralphotometer UMSP I der Firma Zeiss lassen sich spektralphotometrische Messungen im sichtbaren Spektralbereich an

mikroskopischen Präparaten durchführen. Es kann ein separater Schreiber sowie ein Digitalzusatz angeschlossen werden. Von den drei möglichen photometrischen Meßverfahren benutzten wir dasjenige, bei dem über einem feststehenden Meßfleck die Extinktion in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufgezeichnet wird, wobei das Papier im Registrierschreiber und der Monochromator synchron angetrieben wurden.



Prinzipiell wird die Messung nach einem Zweistrahlverfahren durchgeführt, indem das monochromatische,

einstrahlende Licht durch zwei synchron rotierende Spiegelräder in einen Meß- und einen Vergleichs - strahl aufgeteilt wird. Das Licht des Meß- und des Vergleichsstrahls wird in schnellem Wechsel dem - selben Lichtempfänger zugeführt, und ein Kompensationsschreiber zeichnet das Verhältnis zwischen Meß- und Vergleichsstrahl auf. Das Meßsignal ändert sich mit der Transmission des Objekts, wogegen das Vergleichssignal durch eine automatische Spaltverstellung auch bei variabler Wellenlänge konstant gehalten wird.

Auswertung

Die gewonnenen Spektren sind Summenspektren, die sich aus zwei oder mehr Komponenten zusammensetzen. Daraus folgt die Gleichung für einen bei der Wellenlänge $\lambda_1$ gemessenen Extinktionswert

$$E(\lambda_1) = c_1 \cdot \varepsilon_1(\lambda_1) + c_2 \cdot \varepsilon_2(\lambda_1) + \ldots + c_n \cdot \varepsilon_n(\lambda_1)$$

Davon ausgehend kann man mit Hilfe eines Rechnerprogramms ein gegebenes Summenspektrum annähern, wenn man die Spektren der Grundkomponenten kennt.

Als Lösung wählt man die Komponentenzusammensetzung, bei der die quadrierten Abweichungen zwischen gemessenem und errechnetem Summenspektrum ein Minimum erreichen.

Über den Meßbereich von 630 bis 515 nm haben wir 115 Blocks aus Extinktions- und Wellenlängenwert auf Band aufgezeichnet und dann auf Lochkarten übertragen. Die Grundspektren hatten wir in der selben Weise aufgenommen.

## V. Ergebnisse

Nach den ausgearbeiteten Versuchsbedingungen ist es jetzt möglich, $Hb.O_2$-Gradienten in dünnen Membranen einzufrieren, aufzuarbeiten und zu photometrieren, ohne daß sich in dieser Zeit etwas an dem Oxygenierungsgrad ändert. Den Beweis dafür lieferte folgender Versuch.

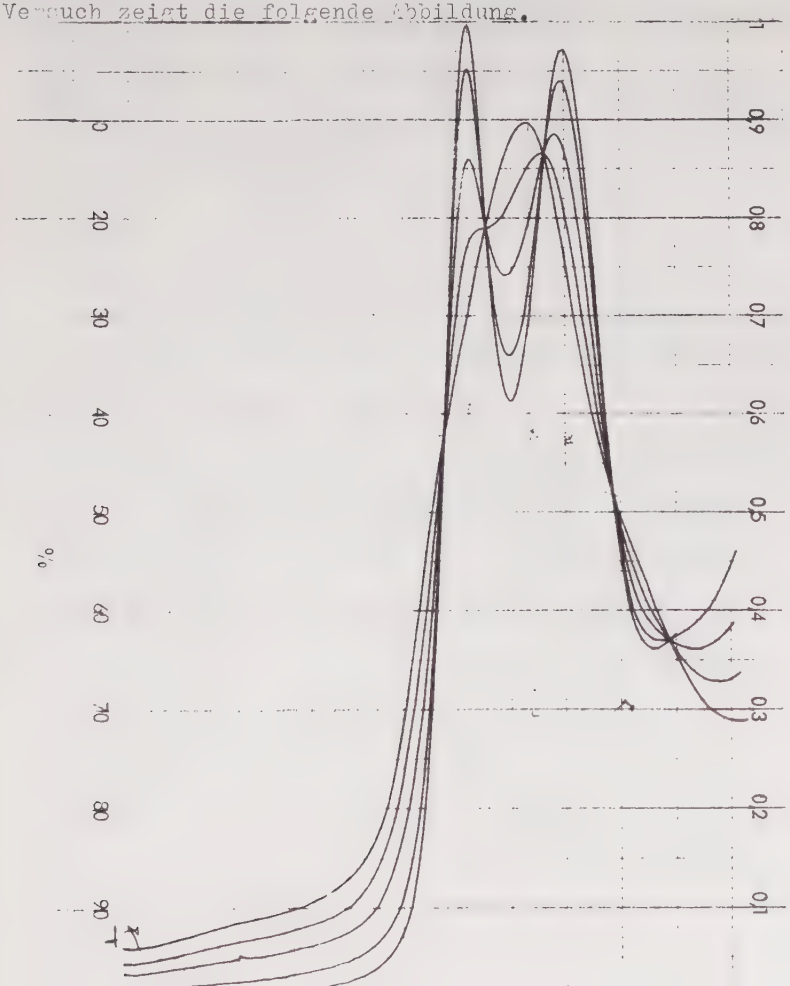
Eine Hämoglobin-haltige Membran wird durch Begasen mit $Stickstoff_{reinst}$ in der Diffusionskammer vollkommen desoxygeniert, dieser Zustand eingefroren und die aufgearbeitete Membran photometriert. Die Spektren an den Rändern und in der Mitte sind identisch und zeigen vollkommen desoxygeniertes Hämoglobin.

Die Spektren entsprechen jedoch nicht dem gewohnten Bild des reduzierten Hämoglobins, sondern zeigen bei 559 nm ein scharfes Maximum. Diese, dem normalen desoxygenierten Hämoglobin überlagerte Komponente haben wir als die deaquatisierte, desoxygenierte Hämoglobin-Form identifiziert. Die deaquatisierten Hämoglobin-Verbindungen sind bereits bekannt[4].

Durch kräftiges Anblasen eines Hämoglobin-haltigen Millipore-Filters und gleichzeitige Photometrie im reflektierten Licht kann man die Bildung der deaquatisierten, desoxygenierten Hämoglobin-Form beobachten. Befeuchtet man dann das Filter unter Luftzutritt, so sieht man wieder das normale $Hb.O_2$-Spektrum. Das Spektrum des deaquatisierten Oxyhämoglobins ist nur schwierig zu erhalten. Es ist mit dem normalen $Hb.O_2$-Spektrum fast identisch, zeigt aber eine deutliche Absorption bei 630 nm. Außerdem geht diese Verbindung leicht in Methämoglobin über[4]. In unseren Versuchen

haben wir bei 630 nm nie eine nennenswerte Absorption beobachtet und haben daraus geschlossen, daß diese Hämoglobin-Form in unserer Versuchsanordnung nicht in bedeutendem Umfang auftritt. Die Möglichkeit, daß das zusätzliche Spektrum evtl. durch Hämochrombildung hervorgerufen wird, haben wir auch untersucht.

In wässriger Lösung kann man aber bei Anwesenheit von zerkleinertem Filter -der in unserem Versuch allein zu einer Denaturierung führen könnte- in einer Durchflußküvette eine vollkommene Desoxygenierung erreichen, indem man Argon durchperlen läßt, ohne daß die im Diffusionsversuch beobachtete Komponente auftritt. Diesen Versuch zeigt die folgende Abbildung.



Damit ist erstmalig die methodische Voraussetzung für die experimentelle Nachprüfung der bisher postulierten theoretischen Hb.$O_2$-Gradienten beim Vorliegen der "facilitated diffusion" gegeben.

Die Brauchbarkeit der Methode haben wir in zwei Versuchen überprüft. Diese wurden unter folgenden Bedingungen ausgeführt:

Millipore-Membranfilter
Hämoglobin haltig

Gasfluß: je 80 ml/min
Temperatur: 37 °C
Luftdruck: 760 Torr

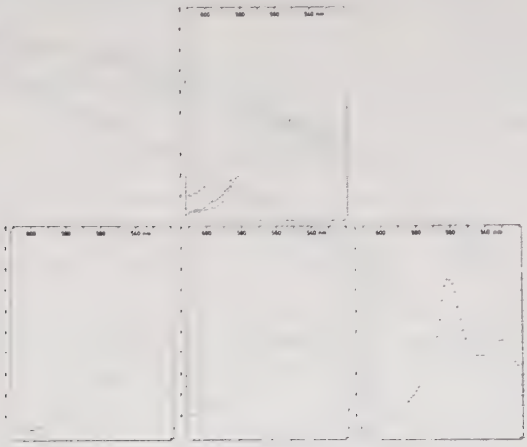
$N_2$-Seite
100 % $N_2$

$O_2$-Seite
5% $O_2$, 95% $N_2$

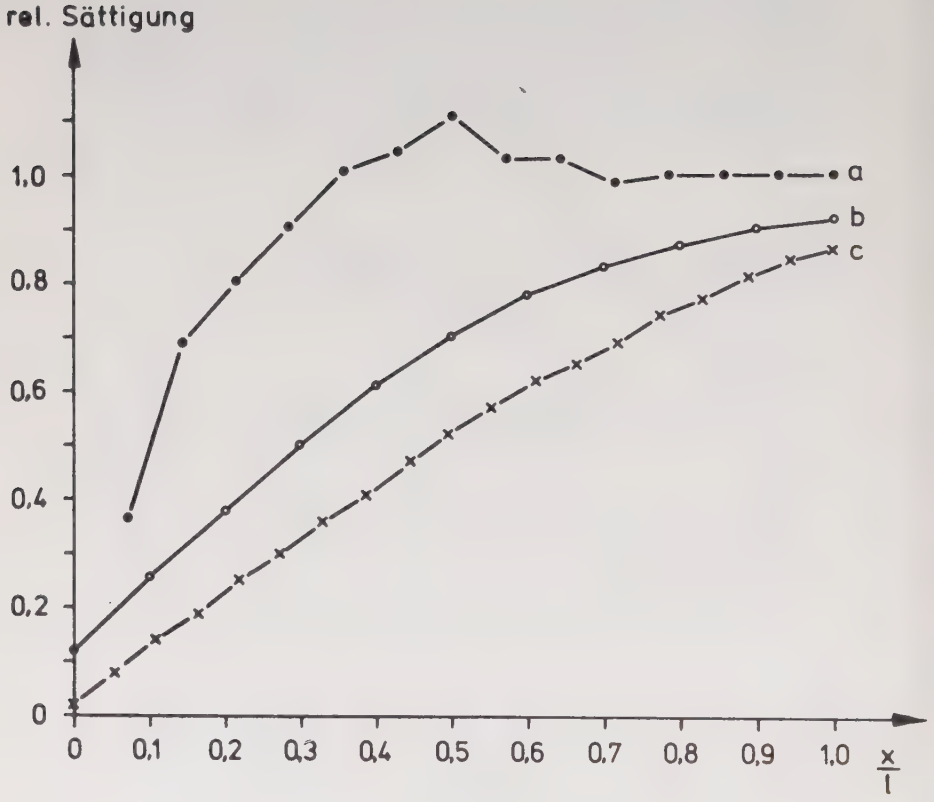
150 µm dick

Die folgende Abbildung zeigt einen Ausschnitt der über den Membranquerschnitt gemessenen Spektren.

Die Auswertung nach der Mehrkomponenten-Methode erfolgte mit den Grundkomponenten $Hb.O_{2(aqua.)}$, $Hb_{(aqu.)}$ und $Hb_{(deaqua.)}$. Die folgende Abbildung zeigt die bei - 100 °C aufgenommenen Komponenten in der angegebenen Reihenfolge.



Die Versuchsergebnisse haben wir in der nachfolgenden Abbildung aufgetragen. Zum Vergleich sind noch die von Kauzmann[15] und Wittenberg[16] für ähnliche Versuchsbedingungen postulierten Kurven aufgetragen.




a): Unsere gemessene Kurve
b): Kurve von Wittenberg
c): Kurve von Kreuzer

Die Kurven von Kreuzer und Wittenberg sind im Maßstab umgerechnet worden, um zu vergleichbaren Meßpunkten zu kommen.

## VI Diskussion

Wie man aus der Abbildung auf Seite 28 ersehen kann, ist es unter den ausgearbeiteten Versuchsbedingungen möglich, $Hb.O_2$-Gradienten in dünnen Membranen zu messen. An dieser Kurve sind zwei Dinge interessant: Ihr Verlauf und die $O_2$-Sättigung des Hämoglobins an der Sauerstoff- sowie Stickstoffseite.

Die zum Vergleich eingezeichneten theoretischen Kurven von Kreuzer und Wittenberg verlaufen deutlich flacher. Die von uns gemessene Kurve ist dem für Myoglobin errechneten Verlauf sehr ähnlich.

Wenn sich der gemessene Kurvenverlauf in weiteren Versuchen bestätigt, muß man an die Teilnahme kleiner Moleküle am "facilitated flux" denken. Eine Möglichkeit der Interpretation bieten evtl. die aufgetretenen deaquatisierten Hämoglobinformen, deren Diffusionsverhalten bisher aber noch nicht untersucht ist. Nach den bisher durchgeführten Versuchen ist nicht mit dem Auftreten größerer Mengen an deaquatisiertem $Hb.O_2$ zu rechnen, das sich durch seine Absorption bei 630 nm hätte zeigen müssen.

Die Auswertung der Randpunkte ergab einen $p_{O_2}$ von 33 Torr auf der $O_2$-Seite. Dieser Wert liegt um ca 3 Torr niedriger als der theoretisch zu erwartende Wert von 36 Torr und würde somit der Theorie entsprechen. Auf der $N_2$-Seite scheint die Kurve auf einen $p_{O_2} > 0$ Torr zu laufen, was ebenfalls der Theorie entspräche. Man muß aber hier deutlich darauf hinweisen, daß aus diesen beiden Versuchen, die zur Prüfung der Methode im

ganzen gemacht wurden, noch nicht so präzise Aussagen gemacht werden können.

## VII Zusammenfassung

Es wurden die Methodik und die Versuchsbedingungen zur Messung von $Hb.O_2$-Gradienten in 150 µm dicken Membranen ausgearbeitet.

Durch die Herstellung vollkommen desoxygenierter Hämoglobin-haltiger Membranen und deren Aufarbeitung bis zur Photometrierung wurde gezeigt, daß während dieser Schritte kein Sauerstoff mit dem Hämoglobin reagiert, was zur Veränderung eines eingestellten Gradienten führen würde.

Es wurde ein $Hb.O_2$-Gradient eingestellt und der Verlauf über den Membranquerschnitt gemessen. Die resultierende Kurve spricht für das Vorliegen einer "facilitated diffusion".

Die Auswertung der Versuche ist erschwert worden durch das Auftreten von deaquatisiertem desoxygeniertem Hämoglobin. Diese Komponente wurde identifiziert und ihre Reaktionen weiter untersucht.

## VIII L i t e r a t u r


1 Collins, R.E. : Transport of gases through hemoglobin solution
Science 133, 1593-1594, 1961

2 Enns, T. : Molecular collison-exchange transport of oxygen by hemoglobin
Proc. Nat. Acad. Sci. US 51,247,1964

3 Fatt, I. and La Force,R.C. : Theory of oxygen transport through hemoglobin solutions
Science 133, 1919-1921, 1961

3a) Grunewald,W. : Dissertation, Marburg, 1972

4 Haurowitz, F. : Hemoglobin, anhydrohemoglobin and oxyhemoglobin
J. biol. Chem. 193, 443-452, 1951

5 Hemmingsen, E. Scholander, P.F. : Spezific transport of oxygen through hemoglobin solutions
Science 132, 1379-1381, 1960

6 Hemmingsen, E. : Accelerated exchange of oxygen-18 through a membrane containing oxygen-saturated hemoglobin
Science 135, 733-734, 1962

7 Kreuzer, F. : Reactions of blood gases with hemoglobin
In: Oxygen transport in blood and tissues, eds Lübbers, D.W., Luft, U.C. Thews, G., Witzleb, E., Stuttgart, Georg-Thieme Verlag,S.21,1968

8 Kreuzer, F. Hoofd, L.J.C. : Facilitated diffusion of oxygen in the presence of hemoglobin
Resp. Physiol. 10, 542-558, 1970

9 Mochizuki, M. Forster, R.E. : Diffusion of carbon monoxide through thin layers of hemoglobin solutions
Science 138, 897-898, 1962

10 Murray, J.C. : On Wyman's facilitated diffusion equ. (aus: Wittenberg, J.B.: Myoglobin-facilitated oxygen diffusion)
Physiol.Rev. Vol.50, Nr. 4, 1970

11 Roughton, F.J.W.: Diffusion and chemical reaction velocity as joint factors in determining the rate of uptake of oxygen and carbon monoxide by the red blood corp.
Proc.Roy.Soc.(London)Ser.B111,1-36,1932

12 Scholander, P.F.: Oxygen Transport through hemoglobin solutions
Science 131, 585-590, 1960

13 Scholander, P.F.: Tension gradients accompanying accelerated oxygen transport in a membrane
Science 149, 876-877, 1965

14 Wang, J.H. : Transport of oxygen through hemoglobin solutions
Science 133, 1770-1771, 1961

15 Wittenberg, J. .: Oxygen transport: a new function proposed for myoglobin
Biol. Bull. 117, 402, 1959

16 Wittenberg, J. .: The molecular mechanism of hemoglobin-facilitated oxygen diffusion
J. Biol. Chem. 241, 104-114, 1966

17 Wittenberg, J.B. : Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle
Physiol. Reviews, Vol.50,Nr.4,1970

18 Wyman, J. : Facilitated diffusion and the possible role of myoglobin as a transport mechanism
J. Biol. Chem. 241, 115-121, 1966

19 Zilversmit, D.B. : Oxygen-hemoglobin system: a model for facilitated membranous transport
Science 149, 874-876, 1965

Herrn Prof. Dr. W.W. Hübbers danke ich für die Themenstellung, wertvolle Ratschläge und die Unterstützung meiner Arbeit.

Lebenslauf

Am 12.11.1941 wurde ich als erstes Kind des Arztes Dr. med. Peter Behrendt und seiner Ehefrau, der Ärztin Dr. med. Irma Behrendt, geb. Hogrefe in Hamburg geboren.
Ab Ostern 1948 besuchte ich sechs Jahre die Grundschule in Hamburg-Eppendorf und anschließend das Gymnasium Hamburg-Lokstedt. Nach einem Umzug im Sommer 1957 wechselte ich die Schule und blieb von da bis zum Abitur am 23.1.1961 auf dem neusprachlichen Zweig der Walddörferschule in Hamburg-Volksdorf.
Nach dem Abitur arbeitete ich zunächst ein halbes Jahr als Haustochter in einem Genfer Haushalt. Mit dem Wintersemester 1961/62 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Hamburg und legte dort im Sommer 1964 die ärztliche Vorprüfung ab. Ab Frühjahr 1965 setzte ich das Studium an der Universität Marburg fort, wo ich es im November 1967 mit dem Staatsexamen beendete.

Vom Januar bis Juli 1968 arbeitete ich als Medizinalassistentin in der Medizinischen Universitätsklinik Marburg, vom August bis Dezember 1968 dann im Pathologischen Institut der Universität Marburg.
Nach einer mehrmonatigen Pause -mittlerweile hatte ich den Diplom-Chemiker Dr. rer. nat. Stefan Schneider geheiratet, und im Februar 1969 wurde unser erster Sohn geboren- arbeitete ich sechs Monate in der Chirurgischen Abteilung des St. Johannes-Hospitals in Dortmund.
Während meiner anschließenden Tätigkeit als Doktorandin im Max-Planck-Institut für Arbeitsphysiologie, Dortmund, vom Dezember 1969 bis Sommer 1970 erhielt ich im März 1970 die Approbation als Ärztin.
Am 24.7.1970 wurde unser zweites Kind geboren. Ab April 1971 bin ich wieder ärztlich tätig und zwar halbtags auf der Urologischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Altenkirchen/Ww.

Meine akademischen Lehrer in Hamburg waren die Herren Professoren und Dozenten:
Bautzmann, Bettendorf, Bleichert, Bramstedt, Dörken, Fleischhauer, Friedrich, Gadermann, Harders, Harmsen, Heinrich, Heyns, Hilz, Hornbostel, Horstmann, Kosswig, Krauspe, Kühnau, Kuhlencordt, Lierse, Luckner, Maaß, Nevius, Meyer, Müller, Nast, Neuert, Rausch-Stroomann, Reichel, Ritter, Roemer, Stelzner, Wartenberg.

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Herren Professoren und Dozenten:
Beckmann, Behrend, Berendes, Bommer, Braun-Falco, Buchholz, Cleve, Dölle, Exner, Ganz, Gedigk, Hamm, Hardewig, Hartmann, Havemann, Herfarth, Hildebrandt, Jacob, Knauff, Krönke, Kunz, Lang, Linneweh, Löhr, Lübbers, Mann, Martini, Marx, Maurath, du Mesnilde Rochemont, Neubauer, Oehmig, Petzoldt, Poetschke, Rodeck, Rohen, Salfeld, Sauer, Schermuly, Schiff, Schleyer, Schlosser, Schmid, Schrappe, Schürmann, Schwaiger, Siegert, Siess, Spiegelberg, Staib, Straub, Streicher, Strohmeyer, Voss, Würterle.